

FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS DE MILHO POR *Meyerozyma caribbica**

VIVIANI TADIOTO^{1,2*}, LETÍCIA M. MILANI^{1,2}, ÉVELN T. BARRILLI^{1,2},
ALINE P. DRESCH^{1,2}, SÉRGIO L. ALVES JR^{2,3}.

1 Introdução

Como subproduto da produção de milho, estima-se que sejam gerados um quilograma de resíduo (palha, caule e bagaço) para cada quilograma de grão (KIM, DALE, 2004). Atualmente, esses resíduos são majoritariamente utilizados para a produção de silagem (ANTUNES, 2018), porém essa biomassa lignocelulósica pode ter como destino a fabricação de um produto de maior valor agregado: o etanol de segunda geração (etanol 2G). A produção desse combustível depende essencialmente de três etapas: (1) pré-tratamento da biomassa, para separar a lignina dos polissacarídeos; (2) hidrólise dos polissacarídeos; e, (3) fermentação dos açúcares oriundos do processo de hidrólise. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo majoritariamente empregado em processos de fermentação alcoólica, incluindo a produção de etanol 1G (obtido, no Brasil, da fermentação do caldo de cana). Contudo, essa levedura, embora seja um fermentador eficiente da glicose (o principal produto da etapa hidrolítica), é incapaz de fermentar a xilose, o segundo monossacarídeo mais abundante nos hidrolisados lignocelulósicos (STAMBUK et al., 2008). Nesse sentido, passa a ser extremamente desejável a caracterização de novas espécies de leveduras que sejam capazes de fermentar a pentose em questão e de garantir a mesma eficiência fermentativa apresentada por *S. cerevisiae* diante da glicose.

2 Objetivo

Caracterização do potencial fermentativo de novas linhagens de levedura da espécie *Meyerozyma caribbica* diante de hidrolisados lignocelulósicos.

1 Discente de ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA, UFFS, *Campus* Chapecó, vivtadioto@gmail.com.

2 Grupo de Pesquisa: PROCESSOS ENZIMÁTICOS E MICROBIOLÓGICOS

3 Doutor BIOTECNOLOGIA, UFFS, *Campus* Chapecó, **Orientador**.

*Título do projeto aprovado no edital nº 1010/GR/UFFS/2018: Avaliação da tolerância de leveduras selvagens ao estresse osmótico na produção de etanol 2G.

3 Metodologia

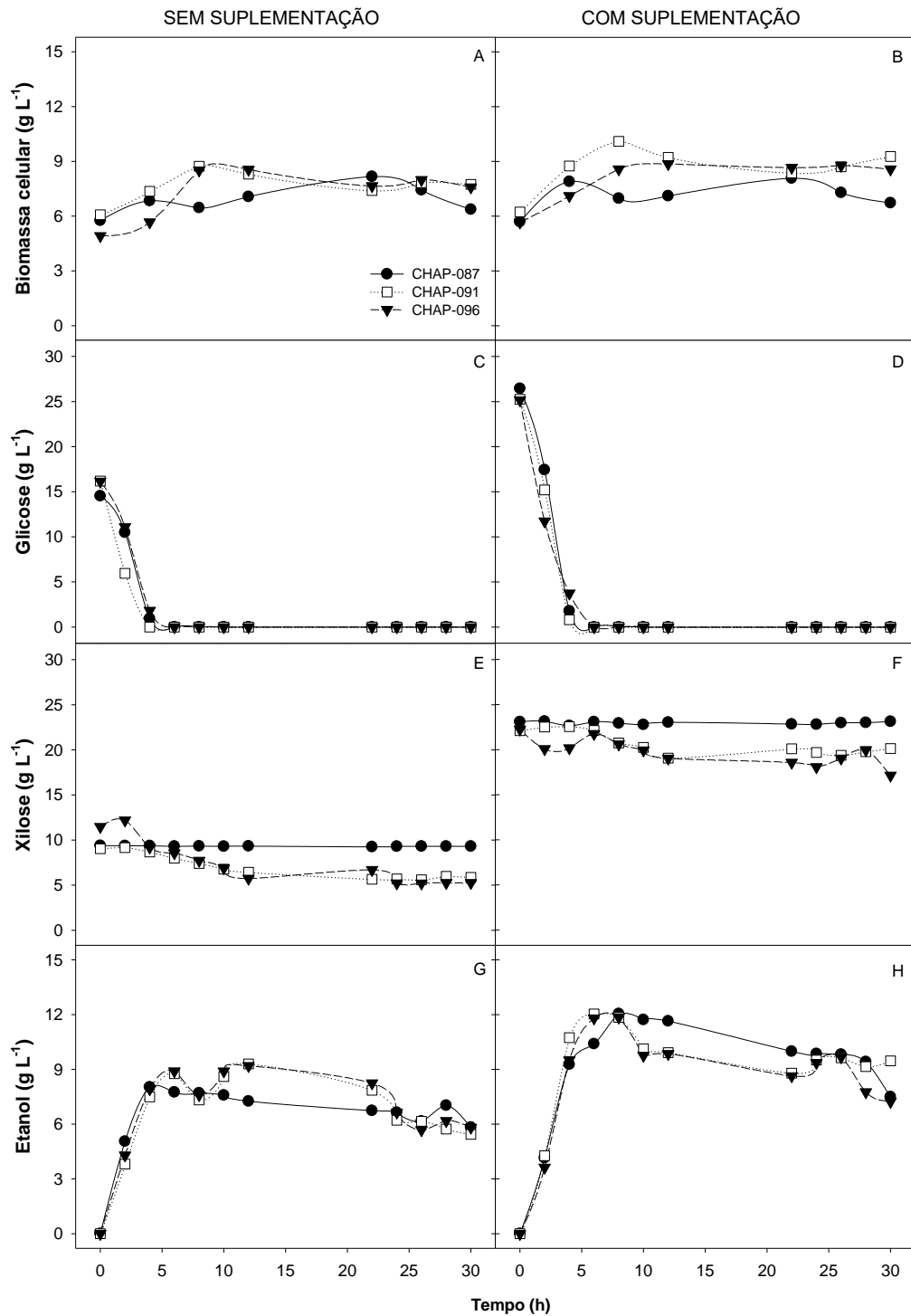
Para a obtenção do hidrolisado, 20 g de biomassa foram adicionados a 200 mL de Ca(OH)_2 , na concentração de $0,2 \text{ g g}^{-1}_{\text{biomassa}}$. Essa suspensão foi mantida por 24 h a 50°C e 200 rpm. Na sequência, o pH foi corrigido para 5,0 e foram adicionados 2% do complexo enzimático CTec2 ($\text{mL g}^{-1}_{\text{biomassa}}$) e 0,5% do HTec2 ($\text{mL g}^{-1}_{\text{biomassa}}$) (Novozymes A/S – Dinamarca), e a reação foi mantida por 24 h a 50°C e 200 rpm.

Para a fermentação, três cepas de *M. caribbica* foram inicialmente pré-cultivadas em YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) até sua fase exponencial de crescimento. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas no hidrolisado de milho (acrescido de $10,5 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura e $3,0 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , pH 5,0) de modo a atingirem a concentração de $\sim 6 \text{ g L}^{-1}$. As fermentações foram realizadas a 25°C , sob 145 rpm, durante 30 h com retirada de amostras para determinação do consumo de açúcares e da produção de etanol. Antes da fermentação, parte do hidrolisado foi suplementado com xilose e glicose de modo a se atingir $\sim 25 \text{ g L}^{-1}$ de cada açúcar. O consumo de açúcares e a produção de etanol foram determinadas em HPLC (fase móvel $5 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$, 50°C , fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ em coluna Aminex HPX-87H, e detecção por índice de refração RID-10).

4 Resultados e Discussão

As três cepas testadas foram capazes de consumir 100% da glicose disponível no hidrolisado nas primeiras 4-6 horas de incubação, tanto nos ensaios sem suplementação de açúcares quanto nos ensaios com suplementação (Figura 1). O consumo de xilose, por outro lado, teve um comportamento bastante distinto: a linhagem CHAP-087 não foi capaz de consumir essa pentose durante as 30 horas, enquanto as cepas CHAP-091 e CHAP-096 consumiram entre 10% e 55% do açúcar. Cabe destacar que o consumo da xilose foi maior nos hidrolisados sem suplementação, com destaque para a linhagem CHAP-096, que consumiu $6,2 \text{ g L}^{-1}$ desse monossacarídeo (Figura 1-E). Esses resultados sugerem que a maior concentração de carboidratos no hidrolisado suplementado pode ter aumentado o estresse celular em vista de uma maior pressão osmótica. De fato, já foi verificado que esse fator pode prejudicar o desempenho fermentativo das leveduras (KIM et al., 2013).

Figura 1. Fermentações em batelada de hidrolisado de caule e palha de milho sem suplementação (A, C, E, G) e com suplementação (B, D, F, H) de açúcares, conduzidas pelas linhagens CHAP-087 (●), CHAP-091 (□) e CHAP-096 (▼).





Por não ter consumido a xilose, a levedura CHAP-087 produziu menos etanol em comparação às outras duas cepas testadas. Já as linhagens CHAP-091 e CHAP-096, que, na condição sem suplementação, consumiram em média 50% da xilose disponível, produziram até 15% mais etanol, indicando que a xilose não foi apenas respirada, mas também fermentada pelas células. Isso corrobora o fato de o pico de etanol para essas leveduras ocorrer de 2 a 6 horas após a exaustão da glicose, o que demonstra que parte do etanol continuou sendo produzido quando terminou o consumo de glicose e iniciou o de xilose.

5 Conclusão

As cepas analisadas no presente trabalho indicam potencial de aplicação da espécie *M. caribbica* na produção de etanol 2G, uma vez que apresentaram rendimento máximo de etanol diante da glicose (assim como se observa para *S. cerevisiae*) e duas delas fermentaram a xilose disponível no meio, o que representa uma superioridade em relação a levedura atualmente empregada na produção brasileira de etanol a partir do caldo de cana.

Referências

- ANTUNES, J. M. Silagem para suprir a escassez de pasto, 2018. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/34247153/silagem-para-suprir-a-escassez-de-pasto>>. Acesso: 24 nov. 2018.
- KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass Bioenergy**. v. 26, p. 361-375, 2004.
- KIM, S. R.; SKERKER, J. M.; KANG, W.; LESMANA, A.; WEI, N.; ARKIN, A. P.; JIN, Y. S. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**. v. 8, p. e57048, 2013.
- STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, E. P. S. (2008) Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **J. Sci. Ind. Res.** v. 67, p. 918-926, 2008.

Palavras-chave: Etanol 2G; Levedura; Xilose; Glicose.

Financiamento: UFFS e CNPq.